

University of Groningen

On the mechanism of cationic lipid-mediated delivery of oligonucleotides

Shi, Fuxin

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2004

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Shi, F. (2004). *On the mechanism of cationic lipid-mediated delivery of oligonucleotides: towards an antisense therapy*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

De ontdekking van de natuurlijke aanwezigheid van antisense oligonucleotiden in eukaryote cellen, die de expressie van specifieke eiwitten kunnen reguleren, heeft in de afgelopen tientallen jaren gezorgd voor een intensieve speurtocht naar de mogelijkheid om deze moleculen toe te passen als geneesmiddel of als moleculair gereedschap in celbiologisch onderzoek. Antisense oligonucleotiden of antisense RNAs bestaan uit enkelvoudige nucleïnezuur ketens met een lengte van 35 tot 150 nucleotiden. In het laboratorium kunnen dergelijke structuren worden gemaakt door chemische synthese. Wanneer de juiste nucleïnezuur volgorde wordt gekozen dan kan een gegeven antisense molecuul binden aan een selectief mRNA wat verantwoordelijk is voor de productie van een specifiek eiwit. Als gevolg daarvan kan de synthese van een eiwit, met name in het geval van een daaraan gekoppeld ziekteproces, onderdrukt worden, waardoor een niet gewenste ontsporing in de cel geen kans krijgt zich verder te ontwikkelen. Dit laatste wordt aangeduid als antisense therapie. Anderzijds kan onderdrukking van de expressie van een eiwit interessante inzichten verschaffen over de functie van dat eiwit in de cel, iets wat bijzonder relevant is in het licht van de onlangs opgehelderde nucleotidenvolgorde van het menselijk genoom. Immers, alhoewel de volledige genetisch code inmiddels ontrafeld is, is de aard en functie van de gecodeerde eiwitten daarmee nog geenszins opgelost. Antisense technologie zou daarbij zeer behulpzaam kunnen zijn. Hoewel het principe van antisense technologie, dat willen zeggen de blokkering van het aanmaken van een nieuw specifiek eiwit door te interfereren met de machinerie (mRNA) die verantwoordelijk is voor deze aanmaak dus betrekkelijk eenvoudig is, zijn in de praktische uitvoering daarvan de nodige barrières te overwinnen.

De eerste uitdaging is om de meest geschikte nucleotiden volgorde van een antisense molecuul te selecteren, waardoor er ook daadwerkelijk een remming in de eiwit productie van het doel-eiwit op zal treden. Daarbij moet rekening worden gehouden met het feit dat het mRNA, waartegen het antisense gericht moet zijn, een goed gedefinieerde driedimensionale structuur bezit. Met andere woorden, het doelgebied in de structuur moet wel toegankelijk zijn voor het antisense molecuul. Deze antisense volgordes worden tegenwoordig grotendeels proefondervindelijk vastgesteld. Echter, met behulp van computertechnologie is

het mogelijk om betere structurele voorspellingen te doen, waardoor het eenvoudiger wordt om geschikte doelstructuren in de mRNA structuur te voorspellen. In feite is deze methode te prefereren boven andere technieken, die vaak tijdrovender zijn.

In dit proefschrift wordt onderzoek beschreven naar het effect van verschillende antisense volgordes op de expressie en het functioneren van een aantal eiwitten, die een functie vervullen als receptor op het oppervlak van neuronale cellen in kweek. Een van die eiwitten, de zogenaamde CRF receptor, speelt een rol bij psychiatrische aandoeningen zoals stress. De gebruikte antisense moleculen werden geselecteerd op basis van de genoemde computer technologie en de verkregen resultaten bevestigen de effectiviteit van deze technologie voor het identificeren van geschikte oligonucleotide als antisense probes.

De activiteit van dergelijke probes kan uiteraard pas worden vastgesteld nadat die stoffen toegang hebben gekregen in de cel en nadat ze daar zijn gearriveerd niet onmiddellijk worden herkend als vreemde stoffen en als gevolg daarvan worden afgebroken. De biologisch stabiliteit van antisense moleculen is dus een belangrijke vereiste. Door chemische modificatie van de structuur kan die stabiliteit van antisense moleculen worden verkregen, zonder dat daarmee de effectiviteit van hun werking wordt beïnvloed. In hoofdstuk 3 wordt beschreven hoe het vervangen van zuurstof door zwavel die gewenste stabiliteit geeft terwijl bovendien het antisense effect van het molecuul intact blijft.

Hoe slaagt een antisense molecuul erin om in de cel zijn doel, nl. een gegeven mRNA dat verantwoordelijk is voor de productie van een specifiek eiwit, te bereiken? Met name voor het toepassen van antisense technologie in proefdieren (*in vivo*) is dit geen triviaal probleem. Wanneer antisense moleculen *in vivo* worden geïnjecteerd, dan worden ze doorgaans vrij snel uit het bloed verwijderd door organen die behoren tot het reticuloendotheliale systeem, zoals de lever en milt. In gekweekte cellen worden antisense moleculen opgenomen via het proces van endocytose, waardoor ze worden afgevoerd naar het afbraak systeem van de cel, de lysosomen. Door geschikte dragers of 'carriers' te gebruiken die antisense moleculen aan zich binden en die bovendien een weefsel-specifiek herkenningssysteem bevatten, is het wellicht mogelijk om ze

specifiek af te geven aan een van tevoren vastgesteld orgaan, zoals hersenen of een tumor weefsel. Een dergelijke carrier zou ook behulpzaam kunnen zijn bij het verhogen van de opname van antisense moleculen door cellen en wellicht in staat zijn om afgifte in het cytoplasma van de cel te bevorderen, hetgeen een belangrijke stap is om een interactie te kunnen aangaan met het mRNA, dat zich deels hier en in de kern van de cel bevindt. Liposomen, gemaakt van cationische lipiden, blijken uitstekend geschikt voor dat doel en dat onderzoek wordt beschreven in hoofdstuk 4. Het blijkt dat de positief geladen lipide moleculen waaruit deze carriers bestaan zeer goed negatief geladen oligonucleotide moleculen kunnen binden. Tevens hebben dergelijke moleculen eigenschappen die berusten op een structurele verandering die belangrijk lijkt te zijn voor het destabiliseren van intracellulaire (endosomale) membranen, hetgeen nodig is voor het vrijkomen van de antisense moleculen in het cytoplasma. Deze studies, die worden beschreven in hoofdstuk 3 en 4 zijn van belang om de antisense technologie verder te optimaliseren.

Wanneer het antisense molecuul eenmaal toegang heeft gekregen tot het cytoplasm, dan blijkt het vrij snel te accumuleren in de kern van de cel. In hoofdstuk 4 wordt beschreven dat dit een belangrijke stap is in het mechanisme waarmee antisense moleculen in staat zijn om uiteindelijk de expressie van een eiwit te remmen. Vastgesteld kon worden dat via binding aan de RNA matrix uiteindelijk het mRNA wordt afgebroken en dat er niet slechts sprake is van de blokkering van expressie via sterische interferentie, waardoor een eiwit nog steeds deels gemaakt zou kunnen worden.

Complexen die bestaan uit cationische lipiden en antisense moleculen hebben de neiging om in vivo te aggregeren. Dat fenomeen werd geconstateerd in experimenten met proefdieren. Om dit proces van complex aggregatie, waardoor het transport naar gewenste weefsels sterk beperkt zou kunnen worden en mogelijk zou kunnen leiden tot toxisch effecten, te beperken, werden mogelijkheden onderzocht om dit tegen te gaan. Daarbij werd gebruik gemaakt van polyethyleenglycol-gekoppelde lipiden die werden ingebouwd in de antisense-bevattende lipide complexen. De eigenschappen van dergelijke complexen werden nader bestudeerd in hoofdstuk 5 en er kon worden aangetoond dat er op deze wijze inderdaad een programmeerbare aflevering van

antisense oligonucleotiden gerealiseerd kan worden. Dat dit uiteindelijk leidt tot een sterke vermindering van de productie en belangrijker, van de functie van specifieke eiwitten zoals van de 5HT1a serotonine receptor, wordt in detail beschreven in hoofdstuk 4.

Het uiteindelijk doel van deze en soortgelijke studies is om antisense technologie toe te passen in vivo, met mogelijk een therapeutisch doel. Om inzicht te krijgen in de potentie daarvan werden experimenten uitgevoerd met hersenweefsel, zogenaamde brain slices, die als model systeem voor in vivo hersenmateriaal fungeren. Tamelijk onverwacht werd vastgesteld dat hersencellen in staat zijn om zeer efficiënt antisense oligonucleotiden op te nemen zonder dat daar een carrier voor nodig is. Dat bleek ook het geval te zijn wanneer antisense oligonucleotiden direct in de hersenen van ratten werden ingebracht. Met behulp van nader onderzoek werd vastgesteld dat hersencellen, het juiste type is nog niet geïdentificeerd, over een nucleotide transport eiwit beschikken dat in staat is antisense oligonucleotiden rechtstreeks in het cytoplasma te transporteren, zoals wordt aangetoond in hoofdstuk 6. Dit transport eiwit is tot nu toe alleen vastgesteld in de nier en blijkt niet in staat te zijn om genen (plasmiden), die ook uit nucleotiden zijn opgebouwd, te transporteren. Voor dat doel en voor de aflevering van antisense oligonucleotiden aan specifieke cellen in de hersenen zijn carriers zoals cationische liposomen nodig.

Tenslotte is bestudeerd of de beschreven carrier, zoals toegepast in de beschreven antisense studies, ook in staat is om eiwitten in de cel te transporteren. Dat zou nieuwe mogelijkheden kunnen bieden voor bijvoorbeeld het bestuderen van de functionele eigenschappen van intracellulaire eiwitten met behulp van antilichamen of voor het inbrengen van therapeutisch relevante eiwitten. In hoofdstuk 7 wordt aangetoond dat met behulp van dezelfde carrier als voor het antisense, ook talloze eiwitten, inclusief antilichamen, in de cel kunnen worden gebracht.

De betekenis en het nut van verdere ontwikkeling van de antisense technologie in het licht van zeer recente bevindingen op een parallel gebied, namelijk dat wat betreft de ontdekking en toepassing van RNAi hetgeen

uiteindelijk resulteert in overeenkomstige effecten als gevonden voor antisense constructen, wordt bediscussieerd in hoofdstuk 8.